



Ministero delle Attività Produttive
Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività
Ufficio Italiano Brevetti e Marchi
Ufficio G2

REC'D 07 OCT 2003
WIPO PCT

Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per: INV. IND.

N. MI2003A000863 DEL 29.04.2003



*Si dichiara che l'unita copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopraspecificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.*

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

03 OCT 2003

HIL DIRIGENTE
Polito Galloppo
Dr. Polito GALLOPPO

BEST AVAILABLE COPY

AL MINISTERO DELLE ATTIVITÀ PRODUTTIVE

UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI - ROMA

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE, DEPOSITO RISERVE, ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO

MODULO A

A. RICHIEDENTE (I)

1) Denominazione AGRISTUDIO S.R.L.
Residenza REGGIO EMILIA codice 017741033
2) Denominazione _____
Residenza _____ codice _____

B. RAPPRESENTANTE DEL RICHIEDENTE PRESSO L'U.I.B.M.

cognome nome Ing. Martino Salvadori - Albo n. 438 BM et al.
denominazione studio di appartenenza BUGNION S.p.A.
via Lancetti n. 17 città MILANO cap 20158 (prov) MI

C. DOMICILIO ELETTIVO destinatario

via _____ n. _____ città _____ cap _____ (prov) _____

D. TITOLO

classe proposta (sez/cl/scl) _____ gruppo/sottogruppo _____/_____/_____

USO DI CHELATI METALLICI IN CAMPO NUTRIZIONALE UMANO ED ANIMALE.

ANTICIPATA ACCESSIBILITÀ AL PUBBLICO:

SI ☐ NO ☒

SE ISTANZA: DATA _____/_____/_____

N° PROTOCOLLO _____

E. INVENTORI DESIGNATI

cognome nome

cognome nome

1) CINTI Enrico 3) _____
2) CIRIBOLLA Antonio 4) _____

F. PRIORITÀ

nazione o organizzazione

tipo di priorità

numero di domanda

data di deposito

allegato
S/R

1) _____
2) _____

SCIOGLIMENTO RISERVE

Data

N° Protocollo

G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA CULTURE DI MICRORGANISMI, denominazione

H. ANNOTAZIONI SPECIALI

DOCUMENTAZIONE ALLEGATA

N. es.

Doc. 1) ☐ 1 ☐ PROV n. pag. 18
Doc. 2) ☐ 1 ☐ PROV n. tav. 98
Doc. 3) ☐ 1 ☐ RIS
Doc. 4) ☐ 1 ☐ RIS
Doc. 5) ☐ 0 ☐ RIS
Doc. 6) ☐ 0 ☐ RIS
Doc. 7) ☐ 0

riassunto con disegno principale, descrizione e rivendicazioni (obbligatorio 1 esemplare)

disegno (obbligatorio se citato in descrizione, 1 esemplare)

lettera d'incarico, procura o riferimento procura generale

designazione inventore

documenti di priorità con traduzione in italiano

autorizzazione o atto di cessione

nominativo completo del richiedente

8) attestati di versamento, totale Euro

DUECENTONOVANTUNO/80COMPILATO IL 29/04/2003

FIRMA DEL(I) RICHIEDENTE(I)

di della AGRISTUDIO S.R.L.

obbligatorio

CONTINUA-SI/NO NOIng. Martino Salvadori - Albo n. 438 BM

DEL PRESENTE ATTO SI RICHIEDE COPIA AUTENTICA SI/NO

SICAMERA DI COMMERCIO IND. ART. E AGR. DI MILANOMILANO

VERBALE DI DEPOSITO

NUMERO DI DOMANDA

M12003A 000863

Reg. A.

codice 15L'anno. DUEMILATREAPRILE

del mese di

Il(i) richiedente(i) sopraindicato(i) ha(hanno) presentato a me sottoscritto la presente domanda di brevetto e fogli aggiuntivi per la concessione del brevetto sopraindicato.

I: ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIALE ROGANTE

IL DEPOSITANTE

dell'Ufficio

M. CORTONESI

L'UFFICIALE ROGANTE

RIASSUNTO INVENZIONE CON DISEGNO PRINCIPALE, DESCRIZIONE E RIVENDICAZIONE

NUMERO DOMANDA

M/2003/000863

REG. A

DATA DI DEPOSITO

20/04/2003

NUMERO BREVETTO

DATA DI RILASCIO

/ /

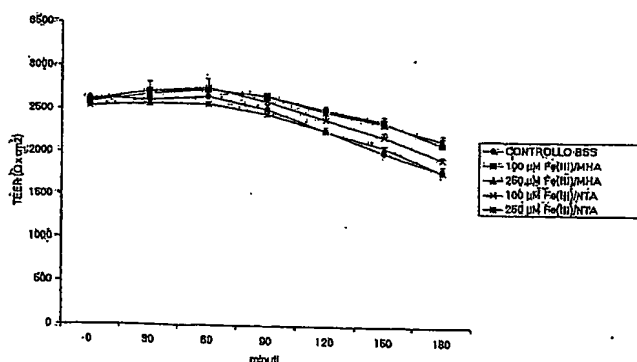
D. TITOLO

USO DI CHELATI METALLICI IN CAMPO NUTRIZIONALE UMANO ED ANIMALE.

L. RIASSUNTO

La presente invenzione ha per oggetto l'utilizzo in campo nutrizionale umano ed animale (animali monogastrici e poligastrici) di noti chelati di metalli bivalenti Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Zn e Fe con la metionina idrossi-analoga. Inoltre, la presente invenzione ha per oggetto un procedimento di preparazione di nuovi chelati con la metionina idrossi-analoga, sia in forma solida con il ferro (II), il vanadio (IV) e (V) e il molibdeno (V) e (VI), sia in forma liquida in soluzione acquosa con il ferro (II) e (III) e cromo (III). Infine, la presente invenzione si riferisce all'impiego di detti nuovi chelati, sia in forma solida con il ferro (II), il vanadio (IV) e (V) e il molibdeno (V) e (VI), sia in forma liquida in soluzione acquosa con il ferro (II) e (III) e cromo (III), nel campo della nutrizione umana ed animale.

M. DISEGNO



DESCRIZIONE

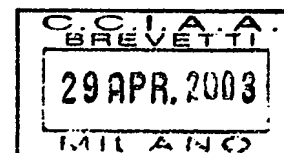
Annessa a domanda di brevetto per INVENZIONE INDUSTRIALE avente per titolo

**“USO DI CHELATI METALLICI IN CAMPO NUTRIZIONALE
UMANO ED ANIMALE”**

A nome: AGRISTUDIO S.r.l., società di nazionalità italiana con sede in
REGGIO EMILIA (RE) **MI 2003 A 0 0 0 8 6 3**

Mandatari: Ing. Giuseppe Righetti iscritto all'Albo con il n. 7BM, Ing. Carlo
Raoul Ghioni iscritto all'Albo con il n. 280 BM, Ing. Martino
Salvadori iscritto all'Albo con il n. 438 BM, Fabrizio Tansini
iscritto all'Albo con il n. 697 BM, Ing. Antonio Nesti iscritto
all'Albo con il n. 792 BM, Ing. Gianmarco Ponzellini iscritto
all'Albo con il n. 901 BM e Ing. Luigi Tarabbia iscritto all'Albo
con il n. 1005 B, della BUGNION S.p.A. domiciliati presso
quest'ultima in MILANO - Viale Lancetti 17.

Depositato il: al n.:



La presente invenzione ha per oggetto l'utilizzo in campo nutrizionale umano ed
animale (animali monogastrici e poligastrici) di noti chelati di metalli bivalenti
Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Zn e Fe con la metionina idrossi-analoga. Inoltre, la
presente invenzione ha per oggetto un procedimento di preparazione di nuovi
chelati con la metionina idrossi-analoga, sia in forma solida con il ferro (II), il
vanadio (IV) e (V) e il molibdeno (V) e (VI), sia in forma liquida in soluzione
acquosa con il ferro (II) e (III) e cromo (III). Infine, la presente invenzione si
riferisce all'impiego di detti nuovi chelati, sia in forma solida con il ferro (II), il

vanadio (IV) e (V) e il molibdeno (V) e (VI), sia in forma liquida in soluzione acquosa con il ferro (II) e (III) e cromo (III), nel campo della nutrizione umana ed animale.

E' noto che un chelato metallico è un composto che si forma da una molecola organica (come un aminoacido o una catena peptidica o un alfa-chetoacido o un alfa-idrossiacido) ed uno ione metallico mediante saldi legami di coordinazione.

Alcuni chelati metallici noti vengono impiegati nel campo della nutrizione umana. Il loro impiego è dovuto all'azione biologica svolta dall'elemento metallico coinvolto, come attivatore, in numerose reazioni enzimatiche, e come regolatore in diverse funzioni metaboliche in tutti gli organismi viventi. La presenza di una molecola chelante favorisce l'assorbimento, la disponibilità e l'utilizzazione dell'elemento metallico in quanto veicolato dalla componente organica in tutti i distretti dell' organismo.

Ciò si traduce anche in una notevole diminuzione delle perdite di metalli non utilizzati nelle deiezioni e quindi in un significativo risparmio economico e in un beneficio ecologico.

Le caratteristiche generali che dovrebbe possedere un chelato metallico ad elevata biodisponibilità sono: (a) neutralità del complesso (la carica positiva del metallo è compensata da quella negativa dei leganti; (b) assenza di controioni negativi (cloruri, solfati); (c) basso peso molecolare del complesso (<1500 Daltons); (d) rapporto metallo/chelante (bidentato) ben definito, possibilmente $\leq 1:2$.

Inoltre i chelati metallici dovrebbero essere ottenuti da processi semplici, puliti e con rese elevate a partire da materie prime facilmente reperibili. Queste caratteristiche possono essere realizzate disponendo di leganti adeguati che

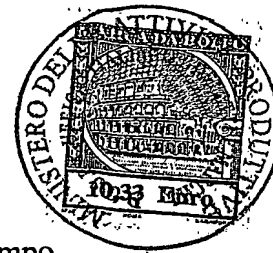
debbono essere facilmente deprotonabili ed avere almeno due atomi donatori in posizione tale da realizzare la chelazione. Esempi di leganti sono dati dagli amminoacidi e altri acidi organici adeguatamente funzionalizzati.

Per quanto riguarda il ferro, la sua somministrazione in forma chelata risulta
5 essere particolarmente efficace contro l'anemia. L'anemia è uno stato patologico del sangue dovuto alla riduzione del numero di globuli rossi, alla diminuzione della quantità di emoglobina o da entrambe le carenze. Il ferro è di fondamentale importanza per l'emoglobina essendo il centro della fissazione dell'ossigeno nell'eme. Le categorie di individui che necessitano di una maggiore quantità di
10 ferro sono le donne con ciclo mestruale o in gravidanza, i bambini sotto i due anni di età, i vegetariani, le persone con emorroidi, le persone soggette ad ulcere ed infine i donatori di sangue. I sintomi avvertiti da una persona anemica sono fatica, una maggiore sensibilità al freddo, irritabilità, perdita di concentrazione e palpitazioni cardiache.

15 Inoltre ferro può difendere dalle infezioni virali o batteriche perchè favorisce la stimolazione del sistema immunitario. In aggiunta il ferro favorisce il metabolismo delle vitamine del gruppo B.

E' noto che la carenza di queste vitamine può provocare disturbi come dermatiti o anche disturbi più gravi come la pellagra (dovuta alla carenza della vitamina
20 B₃). Il ferro interviene nei processi di sintesi dell'adrenalina e della noradrenalina. Infine la mancanza del ferro porta ad una lenta cicatrizzazione delle ferite.

Un primo scopo del presente trovato è proporre un integratore per la somministrazione in campo nutrizionale umano. L'integratore viene anche
25 somministrato a pazienti affetti da una carenza di oligoelementi metallici quali:



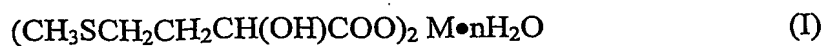
Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Zn e Fe.

Un secondo scopo del presente trovato è proporre un integratore in campo nutrizionale agro-zootecnico da somministrare ad animali monogastrici o poligastrici. L'integratore viene anche somministrato ad animali monogastrici o poligastrici che necessitano di una somministrazione di oligoelementi metallici quali: Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Zn e Fe maggiormente biodisponibili.

Un terzo scopo del presente trovato è proporre un metodo di preparazione di chelati metallici con la metionina idrossi-analoga o un suo sale, sia in forma solida con il ferro (II), il vanadio (IV) e/o vanadio (V) e il molibdeno (V) e/o molibdeno (VI), sia in forma liquida in soluzione acquosa con il ferro (II) e (III) e cromo (III) in cui detti metalli sono legati ad un legante organico bifunzionale con un saldo legame di coordinazione per formare un chelato metallico stabile.

Un ulteriore scopo del presente trovato è proporre l'impiego di detti nuovi chelati, sia in forma solida con il ferro (II), il vanadio (IV) e/o vanadio (V) e il molibdeno (V) e/o molibdeno (VI), sia in forma liquida in soluzione acquosa con il ferro (II) e (III) e cromo (III) per la preparazione di integratori metallici nel campo della nutrizione umana ed animale.

In una realizzazione della presente invenzione, detto primo e secondo scopo sono raggiunti proponendo l'uso di chelati metallici [2:1] aventi la formula generica (I):

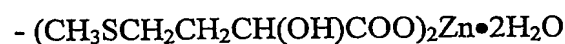


in cui l'agente chelante bifunzionale è l'acido 2-idrossi-4-metiltiobutanoico, un alfa-idrossiacido, noto come "metionina idrossi-analoga" (MHA); M è un catione metallico bivalente scelto dal gruppo consistente di: Co, Ca, Mg, Zn, Fe, Cu e Mn ed n è il numero di molecole di acqua; per la preparazione di

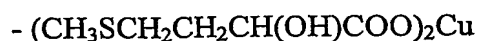
integratori metallici per il trattamento di pazienti affetti da una carenza di oligoelementi metallici o nell'applicazione in campo agro-zootecnico ad animali monogastrici o poligastrici. Nella formula (I) le molecole di acqua sono comprese da zero a dodici, preferibilmente da zero a sei. Ad esempio, da zero a
5 quattro. L'acido 2-idrossi-4-metiltiobutanoico forma un chelato con lo ione ferroso di stechiometria ben definita, contenente due molecole di chelante per atomo di ferro, allo stesso modo con cui forma chelati con i metalli bivalenti Mg, Ca, Mn, Co, Cu, e Zn.

Il metodo per la preparazione dei chelati metallici di formula (I) è stato descritto
10 nella domanda di brevetto internazionale PCT/IT99/00225 e consiste nella reazione diretta della MHA con i rispettivi carbonati dei metalli bivalenti Mg, Ca, Mn, Co, Cu e Zn.

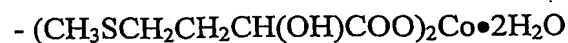
La Richiedente ha trovato vantaggioso impiegare nel campo nutrizionale umano i seguenti chelati metallici:



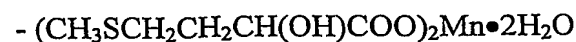
Le due molecole di acqua non sono legate al metallo.



E' un complesso anidro senza molecole di acqua legate al metallo.



20 Le due molecole di acqua sono complessate.



Le due molecole di acqua sono complessate.



Le due molecole di acqua non sono legate al metallo.



Le due molecole di acqua non sono legate al metallo.

In un'altra realizzazione della presente invenzione, detto terzo scopo è raggiunto proponendo un metodo per la preparazione di chelati metallici con la metionina idrossi analoga o un suo sale, sia in forma solida con il ferro (II), il vanadio (IV) e/o vanadio (V) e molibdeno (V) e/o molibdeno (VI), sia in forma liquida in soluzione acquosa con il ferro (II) e (III) e il cromo (III).

Nel caso del vanadio e del molibdeno il procedimento di preparazione dei loro chelati consiste nella reazione dei corrispondenti ossidi con la metionina idrossi analoga.

Alternativamente, nel caso del vanadio e del molibdeno il procedimento di preparazione dei loro chelati consiste nella reazione dei corrispondenti sali metallici con la metionina idrossi analoga.

Ad esempio, ad una quantità di V_2O_5 o MoO_3 solido viene addizionata una soluzione di metionina idrossi-analoga a caldo e sotto agitazione. Dalla reazione si ottiene una soluzione limpida ed un precipitato solido di un chelato di vanadio o di molibdeno.

Nel caso del ferro (II) il metodo di preparazione avviene per reazione del sale sodico della MHA (o un sale di un metallo alcalino o alcalino-terroso) con il solfato ferroso (o un qualsiasi altro sale solubile di ferro (II)) in ambiente acquoso.

Il rapporto molare MHA/Ferro(II) è 2:1 per la completezza della reazione. Il chelato ferroso precipita dall'ambiente di reazione e viene filtrato e lavato con acqua per eliminare il solfato di sodio solubile che si forma.

Dopo filtrazione e lavaggio, il prodotto chelato viene poi essiccato e per ridurre la quantità di acqua adsorbita. Il prodotto si presenta come una polvere giallo-

pallida scarsamente solubile in acqua di formula:



Le molecole di acqua sono direttamente legate al ferro (dati TGA).

Lo spettro vibrazionale nell'infrarosso testimonia l'avvenuta chelazione: infatti

5 lo spettro presenta una serie di bande caratteristiche in accordo con la struttura mostrata sopra.

In particolare si osserva la banda dovuta allo stiramento asimmetrico del gruppo carbossilico a 1596 cm^{-1} , significativamente spostata a basse frequenze rispetto alla MHA libera (1720 cm^{-1}) come atteso per la deprotonazione e la

10 coordinazione. Si ottiene in tal modo un prodotto puro e stabile.

In una realizzazione della presente invenzione soluzioni stabili di chelati di ferro (III) e cromo (III) con MHA possono essere ottenute per dissoluzione in ambiente acquoso di sali solubili di ferro o cromo (III) e di MHA in rapporto

15 $\text{MHA}/\text{M(III)} \geq 2$, preferibilmente 3 e mantenendo il pH ad un valore adeguato in modo da impedire la precipitazione dei corrispondenti idrossidi.

In un'altra realizzazione preferita della presente invenzione, detto quarto scopo è raggiunto proponendo l'impiego di detti nuovi chelati, sia in forma solida con il ferro (II), il vanadio (IV) e (V) e il molibdeno (V) e (VI), sia in forma liquida in

20 soluzione acquosa con il ferro (II) e (III) e cromo (III) per la preparazione di integratori metallici nel campo della nutrizione umana ed animale.

I chelati metallici descritti nella presente invenzione possono essere impiegati in miscela tra loro in vari rapporti quantitativi per la preparazione degli integratori metallici. Pertanto, gli integratori che vengono proposti sia nel campo della nutrizione umana che nel campo della nutrizione animale possono contenere

25 uno o più dei chelati metallici oggetto della presente invenzione.



Con riferimento ai chelati metallici sopra descritti ed oggetto della presente invenzione, la Richiedente ha condotto una serie di prove sperimentali.

Sperimentazione *in vitro*

Per la sperimentazione *in vitro* sono state impiegate cellule di adenocarcinoma del colon umano (CACO-2) che sono il sistema *in vitro* maggiormente impiegato per studi sulla funzionalità intestinale, in particolare per il trasporto transepiteliale, in quanto le cellule (CACO-2) sviluppano caratteristiche ultrastrutturali, funzionali ed elettriche sovrapponibili a quelle del piccolo intestino.

La formazione di giunzioni intercellulari può essere monitorata attraverso misure di resistenza elettrica transepiteliale (TEER) del monostrato di cellule. Poiché le giunzioni intercellulari limitano il movimento (para cellulare) dei soluti, le alterazioni della TEER sono normalmente impiegate come indice di permeabilità di tali giunzioni.

L'apparecchiatura impiegata per fare crescere e differenziare le cellule è riportato in figura 1.

Tali cellule, indicate con A in figura 1, sono state fatte crescere e differenziare su un supporto (filtro permeabile), indicato con B in figura 1 fino ad avere la formazione di un monostrato di cellule differenziate unite tra loro da giunzioni intercellulari funzionali. Tale filtro B separa l'ambiente apicale C, (AP), (che simula il lumen intestinale) dall'ambiente basolaterale D, (BL), posto nella camera inferiore, che simula il flusso sanguigno a livello capillare.

Tali cellule sono state trattate per 3 ore con due diverse concentrazioni di Fe(III)/MHA (1:3) e Fe (III)/NTA (1:2), (acido nitrilico triacetato preso come chelato di riferimento), in una soluzione tamponata a pH 5,5 e a 37 °C. Dette

soluzioni sono state poste nel compartimento apicale C (AP), mentre, il compartimento basolaterale D (BL) conteneva una soluzione di apostransferrina libera da ferro posta in una soluzione tamponante a pH 7,4.

Durante lo stesso esperimento, a preordinati intervalli di tempo, è stata misurata la TEER in $\Omega \cdot \text{cm}^2$, figura 2 (ogni 30 minuti lungo la durata di 3 ore) e figura 3 dopo 24 ore.

I risultati sono riportati in figura 4 nella quale si riporta il contenuto di ferro intracellulare dopo 3 ore di trattamento con Fe(III)/MHA e Fe (III)/NTA a diversi valori di concentrazione . I dati sono espressi in nmoli ferro/filtro.

Come si evince dalla figura 4, il passaggio di chelato ferro/MHA dall'ambiente apicale, C, alla cellula è maggiore rispetto a quello osservato nel controllo.

Inoltre, dalla figura 5 (nella quale viene mostrato il trasporto di ferro dall'ambiente apicale C all'ambiente basolaterale D dopo trattamento con due concentrazioni diverse di Fe(III)/MHA e Fe (III)/NTA) si evince che la concentrazione di ferro trasportato è comparabile. I dati sono espressi in nmoli ferro/filtro.

I dati riportati in figura 4 e 5 confermano che il chelato di ferro viene fortemente assorbito dalle cellule dei micro villi intestinali e si sposta nel flusso sanguigno

Dalla figura 2, (che riporta le misure di TEER) si evince che le giunzioni intercellulari si mantengono inalterate a dimostrazione della non tossicità del chelato di ferro nei confronti delle cellule contrariamente a quanto accade nel caso di ferro non chelato come il ferro solfato.

In figura 3 viene riportata la misura di TEER a 24 ore dopo che la soluzione tamponante a 5,5 contenente ferro/MHA o ferro/NTA è stata rimossa mantenendo le cellule in coltura. Tale figura 3 evidenzia come il chelato di ferro/MHA

rimanga stabile all'interno delle cellule non causandom alcun effetto tossico.

In definitiva, le prove dimostrano che i chelati MHA/M, oggetto della presente invenzione, sono efficacemente assorbiti, stabili all'interno delle cellule intestinali e non tossici.

5 I risultati sopra mostrati confortano l'impiego di detti nuovi chelati, sia in forma solida con il ferro (II), il vanadio (IV) e/o vanadio (V) e il molibdeno (V) e/o molibdeno (VI), sia in forma liquida in soluzione acquosa con il ferro (II) e (III) e cromo (III) per la preparazione di integratori metallici nel campo della nutrizione umana ed animale.

10 Prove in vivo

Tali prove hanno coinvolto sia animali monogastrici (come il suinetto) che animali poligastrici (come il vitellone da carne).

a) Animali monogastrici (suinetti)

15 A due gruppi sperimentali di suinetti (Controllo e Test) di 35 giorni di età svezzati a 19 giorni è stata somministrata un alimento che differiva solamente per la fonte di zinco.

L'alimento ricevuto era costituito, per kg. di alimento tal quale, da 3500 Kcal ED, 1,15 g di lisina, e un apporto di zinco elemento totale di 81 mg (81 ppm), di cui 31 mg (31 ppm) era apportato dalle materie prime mentre 50 mg (50 ppm),
20 rispettivamente come zinco solfato (Controllo) e come zinco chelato con MHA (Test) oggetto della presente invenzione.

I due gruppi di animali, furono bilanciati per nidiata, pesovivo e sesso e furono alimentati per 27 giorni. Altri 4 animali furono sacrificati subito e di essi fatto un campionamento secondo la procedura di seguito riportata. I due gruppi di
25 animali furono pesati prima di iniziare il test e dopo 27 giorni. Alla fine del test i

suinetti furono sacrificati e da ogni soggetto furono rimossi e pesati stomaco, intestino, rene sinistro e fegato. Lo stomaco e l'intestino furono svuotati e ripesati al fine di avere il peso netto di tali organi. Dal rene, fegato e cervello fu rimosso un campione e lo stesso congelato. Lo stomaco, l'intestino, il rene
5 sinistro e il fegato furono poi rimessi insieme al resto della carcassa, ed omogeneizzati con un macinatore. Dalla massa ottenuta si prelevò quindi un campione per essere congelato. I campioni furono quindi disidratati con l'ausilio di un disidratatore e sottoposti ad analisi chimica.

Sui campioni liofilizzati furono determinati il livello di zinco, rame e ferro
10 mediante spettroscopia atomica di assorbimento. I livelli di zinco nel corpo furono riferiti al prodotto stesso.

Sulla base del peso "netto" (cioè privo del contenuto del tratto digestivo) del corpo e del suo contenuto di zinco all'inizio e alla fine della prova fu possibile stimare anche la ritenzione giornaliera di zinco. I risultati delle analisi chimiche
15 effettuate sui campioni sono riportati in tabella 1. I suinetti furono sacrificati ad un peso medio di 16,2 Kg. L'incremento medio di peso giornaliero fu di 324 g.

Come si evince dai dati riportati in tabella 2 in merito alla ritenzione giornaliera di zinco delle due diverse fonti, l'integrazione di chelato di zinco, è stata ritenuta dall'organismo il 26% in più ($P=0,07$) rispetto all'integrazione con solfato di
20 zinco. In tabella 3 sono riportati i dati riguardanti l'effetto della fonte di zinco sul contenuto di zinco, rame e ferro nel fegato, rene e cervello e quindi sulle interazioni con tali elementi presenti nella dieta in forma inorganica. Nota infatti è l'interazione che tali ioni liberi esercitano riducendo l'uno l'assorbimento dell'altro.

25 Il contenuto nel fegato dei tre minerali non risultò essere influenzato dalla dieta



e quindi dalla fonte di zinco. Valori medi furono 296 mg/Kg per lo zinco, 63 mg/Kg per il rame e 220 per il ferro. Mentre il rene presentò un contenuto maggiore di zinco (+18 %, $P=0,07$), di ferro (+36 %, $P<0,01$) e di rame (+36% $P=0,12$) non raggiungendo solo per quest'ultimo la soglia di significatività statistica, seppure mostrando una tendenza verso l'aumento della ritenzione di tale elemento metallico.

Nel cervello si apprezzò una tendenza verso una maggiore contenuto di zinco (+13%), di rame (+20%), di ferro (+25%)

I risultati ottenuti evidenziano una migliore biodisponibilità dell'elemento metallico sotto forma chelata rispetto a fonti inorganiche quali solfati ed inoltre una minore interazione con altri ioni, con un conseguente maggiore ritenzione di questi ultimi.

Come noto il suino rappresenta uno dei modelli animali più vicino all'uomo e come tale viene spesso impiegato come modello di valutazione e di studio in campo umano.

b) Animali poligastrici (bovini da carne)

Due gruppi di vitelloni Charolaise femmine (di 30 mesi) di 6 animali ciascuno, con un peso medio iniziale di 567 kg. (Controllo) e di 565 kg. (Test) furono alimentati per 90 giorni con una razione identica. La sola differenza era data dal fatto che al gruppo di Controllo fu somministrato carbonato di zinco e al gruppo di Test il chelato di zinco, oggetto della presente invenzione. L'ingestione giornaliera fu pari a 22Kg/capo e l'apporto totale giornaliero di zinco elemento fu di 700 mg.

Di ciascun animale furono raccolti il peso vivo all'inizio e alla fine del test, il peso morto e la resa di macellazione. I dati sono riportati in tabella 4

Gli animali alimentati con chelato di zinco rispetto a quelli alimentati con carbonato di zinco presentarono un peso finale significativamente maggiore (652 kg. v.s 642 kg., $p < 0.05$) , un incremento ponderale giornaliero significativamente maggiore (1039 gr. v.s. 931 gr., $p < 0.05$) un peso della carcassa significativamente maggiore (377 kg. v.s. 366 kg., $P < 0.01$), ed una rese significativamente maggiore (57,83% v.s. 57,03%; $p < 0.01$). I dati sono raccolti in tabella 4. L'effetto dovuto alla presenza del chelato di zinco nella razione somministrata agli animali è riportato in tabella 5.

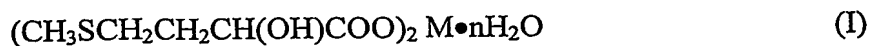
Tali risultati dimostrano un evidente miglioramento delle performance zootecniche sopracitate del chelato di zinco rispetto a fonti inorganiche dello stesso elemento.

Costanti di stabilità per i differenti complessi Fe/MHA sono stati calcolati con titolazioni potenziometriche. La stabilità dei complessi del ferro(III) è molto alta e le spece chelate si formano anche a pH acido. Ioni Fe^{3+} non complessati sono presenti solo a pH molto bassi ($< 2,5$), mentre a pH più alti tutto il ferro(III) è complessato come specie chelata metallo/ligando = 1:2.

RIVENDICAZIONI

1. Uso di almeno un chelato metallico scelto tra quelli aventi formula generica

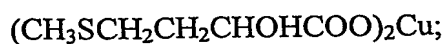
(I):



in cui: M è un catione metallico bivalente scelto dal gruppo consistente di:
Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Zn e Fe e, n è il numero di molecole di acqua; per la
preparazione di un integratore per la somministrazione in campo nutrizionale
umano.

2. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui l'integratore viene somministrato a
pazienti affetti da una carenza di oligoelementi metallici quali Mg, Ca, Mn,
Co, Cu, Zn e Fe.

3. Uso secondo la rivendicazione 1, in cui detto almeno un chelato metallico è
scelto dal gruppo comprendente:



per la preparazione di un integratore per la somministrazione in campo
nutrizionale umano.

4. Uso secondo la rivendicazione 3, in cui l'integratore viene somministrato a
pazienti affetti da una carenza di oligoelementi metallici quali: Mg, Ca, Mn,
Co, Cu, Zn, e Fe.

5. Uso di almeno un chelato metallico scelto tra quelli aventi formula generica

(I):

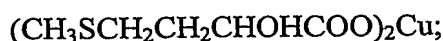


in cui: M è un catione metallico bivalente scelto dal gruppo consistente di:

Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Zn e Fe e, n è il numero di molecole di acqua; per la
preparazione di un integratore in campo nutrizionale agro-zootecnico da
somministrare ad animali monogastrici o poligastrici.

6. Uso secondo la rivendicazione 5, in cui l'integratore viene somministrato ad
animali monogastrici o poligastrici affetti da una carenza di oligoelementi
metallici quali Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Zn e Fe.

7. Uso secondo la rivendicazione 5, in cui detto almeno un chelato metallico è
scelto dal gruppo comprendente:



per la preparazione di un integratore in campo nutrizionale agro-zootecnico
da somministrare ad animali monogastrici o poligastrici.

8. Uso secondo la rivendicazione 7, in cui l'integratore viene somministrato ad
animali monogastrici o poligastrici affetti da una carenza di oligoelementi
metallici quali Mg, Ca, Mn, Co, Cu, Zn e Fe.

9. Un procedimento per la preparazione di un chelato metallico

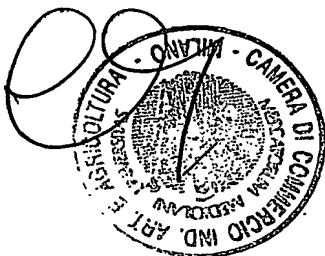


$(\text{CH}_3\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CHOHCOO})_2\text{Fe}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ comprendente una fase nella quale un sale di un metallo alcalino o alcalino terroso della metionina idrossi-analoga viene fatto reagire con un sale solubile di ferro(II) in ambiente acquoso.

10. Il procedimento secondo la rivendicazione 9, in cui la reazione avviene tra il sale sodico della metionina idrossi-analoga ed il solfato ferroso.
11. Il procedimento secondo la rivendicazione 9 o 10, in cui il chelato di ferro(II) ottenuto dalla reazione viene filtrato e lavato con acqua.
12. Un procedimento per la preparazione di un chelato metallico di vanadio comprendente una fase nella quale un ossido o un sale di vanadio (V) viene fatto reagire con una soluzione di metionina idrossi-analoga.
13. Il procedimento secondo la rivendicazione 12, in cui l'ossido di vanadio è V_2O_5 .
14. Il procedimento secondo la rivendicazione 12 o 13, in cui la reazione avviene a caldo e sotto agitazione.
15. Uso dei chelati metallici di vanadio preparati secondo una delle rivendicazioni da 12 a 14, per la preparazione di un integratore per la somministrazione in campo nutrizionale umano.
16. Uso dei chelati metallici di vanadio preparati secondo una delle rivendicazioni da 12 a 14, per la preparazione di un integratore in campo nutrizionale agro-zootecnico da somministrare ad animali monogastrici o poligastrici.
17. Un procedimento per la preparazione di un chelato metallico di molibdeno comprendente una fase nella quale un ossido o un sale di molibdeno (VI) viene fatto reagire con una soluzione di metionina idrossi-analoga.
18. Il procedimento secondo la rivendicazione 17, in cui l'ossido di molibdeno è

MoO₃.

19. Il procedimento secondo la rivendicazione 17 o 18, in cui la reazione avviene a caldo e sotto agitazione.
20. Uso dei chelati metallici di molibdeno preparati secondo una delle rivendicazioni da 17 a 19, per la preparazione di un integratore per la somministrazione in campo nutrizionale umano.
21. Uso dei chelati metallici di molibdeno preparati secondo una delle rivendicazioni da 17 a 19, per la preparazione di un integratore in campo nutrizionale agro-zootecnico da somministrare ad animali monogastrici o poligastrici.
22. Una soluzione acquosa stabile di complessi di ferro (III) o cromo (III) con MHA dove il rapporto molare MHA/M(III) è ≥ 2 .
23. Un procedimento per la preparazione di una soluzione acquosa stabile secondo la rivendicazione 22, comprendente una fase nella quale la metionina idrossi-analoga MHA viene fatta reagire con una soluzione acquosa di un sale solubile di ferro (III) o cromo (III).
24. Uso di una soluzione stabile di di complessi di ferro (III) o cromo (III) secondo la rivendicazione 22, per la preparazione di un integratore per la somministrazione in campo nutrizionale umano.
25. Uso di una soluzione stabile di di complessi di ferro (III) o cromo (III) secondo la rivendicazione 22, per la preparazione di un integratore in campo nutrizionale agro-zootecnico da somministrare ad animali monogastrici o poligastrici.



IL MANDATARIO
Ing. Martino Salvadori
Albo n. 438 BM

TABELLA n. 1

		Chelato	Solfato	E.M.S.
Giorni n.	n	26.3	26.4	
Peso vivo iniziale	Kg	7.54	7.33	0.50
Peso vivo finale	Kg	16.14	16.20	0.55
Incremento giornaliero	gr.	327	321	11
Dieta	gr.	544	548	1.9
Indice di conversione		1.68	1.72	0.054
Peso vivo iniziale netto	Kg	7.31	7.49	0.48
Peso finale netto	Kg	15.57	15.76	0.55
Incremento giornaliero netto	gr.	314	313	11

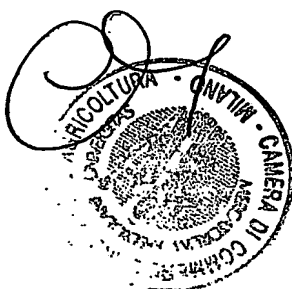
TABELLA n.2

		Chelato	Solfato	E.M.S.
Ritenzione giornaliera Zn	mg	5.40	5.27	0.37

TABELLA n.3

	Chelato	Solfato	E.M.S.	Significatività statistica
Fegato				
Zinco	292	300	21	P=0.80
Rame	63.6	62.5	6.3	P=0.91
Ferro	240	199	35	P=0.44
Rene				
Zinco	97.5	82.3	5.5	P=0.07
Rame	55.0	40.2	6.4	P=0.12
Ferro	244	179	11.8	P<0.01
Cervello				
Zinco	53.9	47.6	3.5	P=0.23
Rame	28.1	23.3	3.5	P=0.35
Ferro	100.9	80.6	9.9	P=0.17

MI 2003 A 0 0 0 8 6 3



IL MANDATARIO
 Ing. Martino SALVADORI
 Iscritto all'Albo con il n. 438

TABELLA n.4

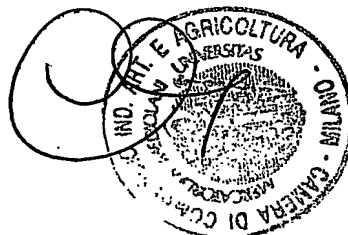
Dieta	Peso Iniziale	E.M.S.
Controllo	567.700000	31.845747
Zn	565.633333	31.845747
	Peso finale	E.M.S.
Controllo	642.	2.694781
Zn	652.	2.691923
Controllo Vs Zn $P < 0.05$		

Dieta	Incremento giornaliero	E.M.S.
Co	931.	29.94201
Zn	1039.	29.91025
Controllo Vs Zn $P < 0.05$		

Dieta	Peso carcassa	E.M.S.
Controllo	366.	1.812368
Zn	377.	1.810445
Controllo Vs Zn $P < 0.01$		

Dieta	Peso di macellazione	E.M.S.
Controllo	57.03	0.1132212
Zn	57.85	0.1131011
Controllo Vs Zn $P < 0.01$		

MI 2003 A 0 0 0 8 6 3



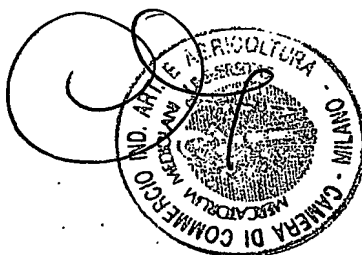
IL MANDATARIO
 Ing. Marino SALVADORI
 iscritto all'Albo con il n. 438

TABELLA N.5

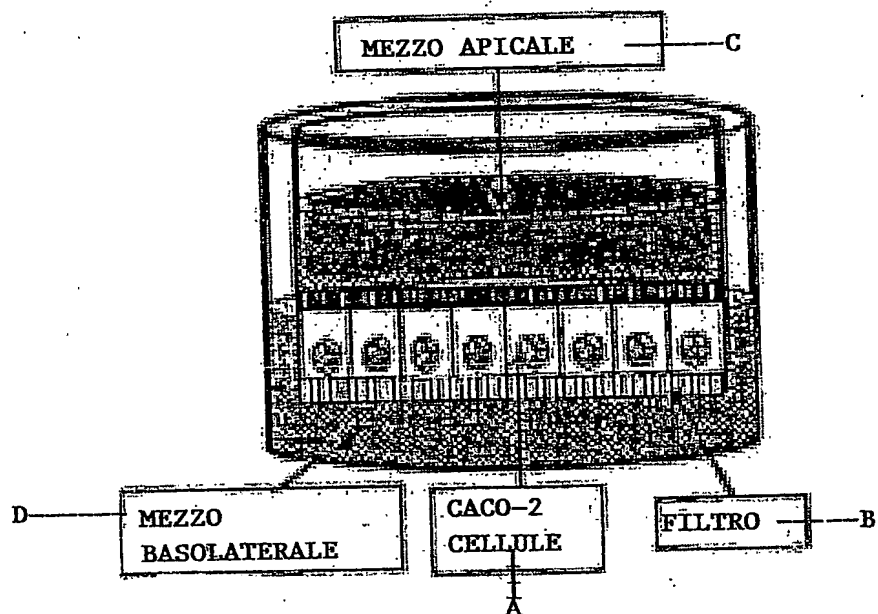


CONTROLLO	Numero bovino	Peso iniziale Kg	Peso finale Kg	Incremento giornaliero gr.	Incremento totale Kg	Peso morto Kg.	Peso di macellazione Kg.
	1	583.5	670.75	1050	94.50	383	0.578
	2	583.5	670.75	970	87.30	383	0.571
	3	599.5	675.96	850	76.50	388	0.574
	4	540.9	623.67	920	82.80	353	0.566
	5	568.1	649.12	900	81.00	370	0.570
	6	532.3	624.13	1020	91.80	357	0.572
TEST							
	Numero bovino	Peso iniziale Kg	Peso finale Kg	Incremento giornaliero gr.	Incremento totale Kg	Peso Morto Kg	Peso di macellazione Kg.
	1	625.6	724.61	1100	99.00	421	0.581
	2	676.8	789.29	1250	112.5	457	0.579
	3	582.7	686.21	1150	103.5	398	0.580
	4	564.0	653.98	1000	90.00	378	0.578
	5	476.5	557.49	900	81.00	320	0.574
	6	468.2	548.28	890	80.10	318	0.580

MI 2003 A 0 00 8 6 3

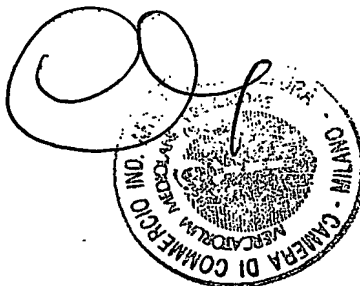


IL MANDATARIO
 Ing. Martino SALVADORI
 Iscritto all'Albo con il n. 438

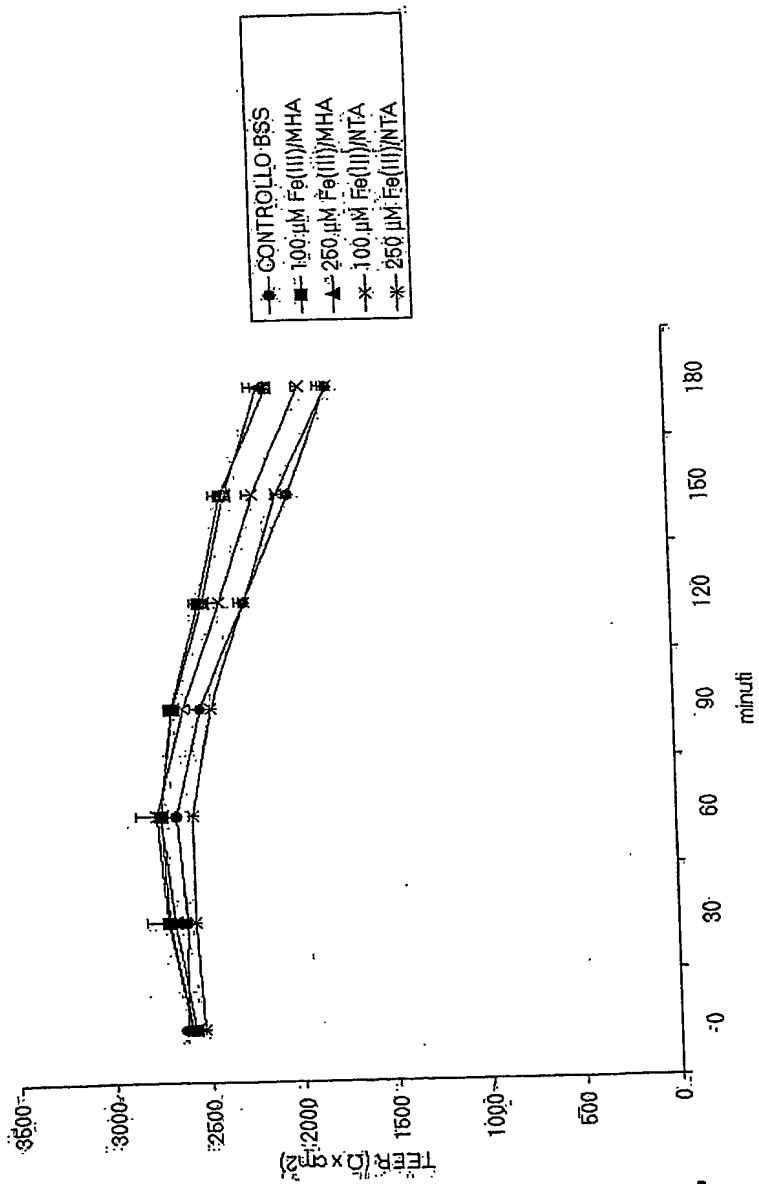


MI 2003 A 0 0 0 8 6 3

FIGURA 1

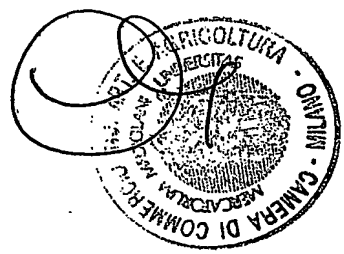


[Signature]
IL MANDATARIO
 Ing. Martino SALVADORI
 iscritto all'Albo con il n. 438

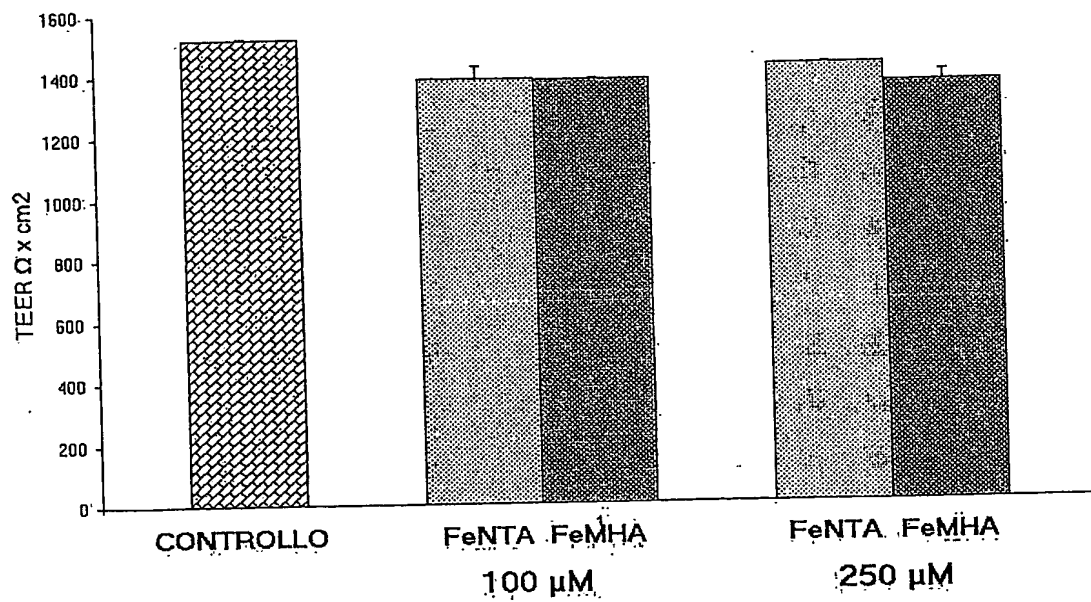


MI 2003A 0 00863

FIGURA 2

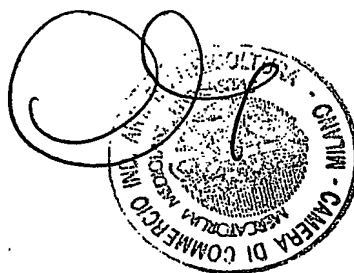


IL MANDATARIO
Ing. Martino SATVADORI
iscritto all'Albo con il n. 438

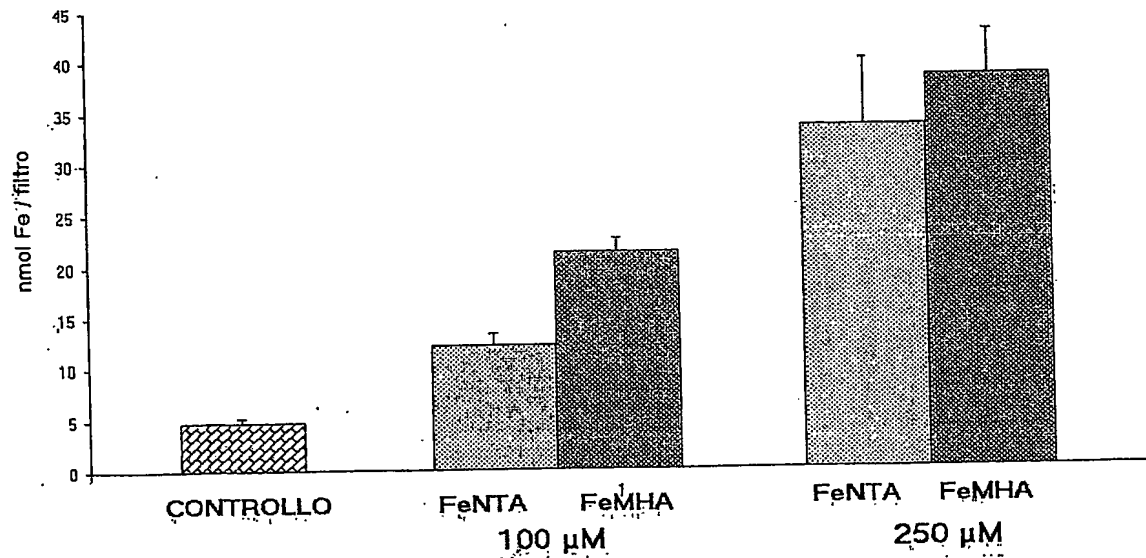


MI 2003A 000863

FIGURA 3

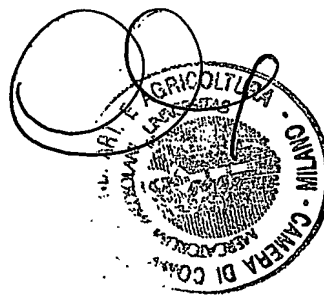


IL MANDATARIO
Ing. Martino SALVADORI
Iscritto all'Albo con il n. 438

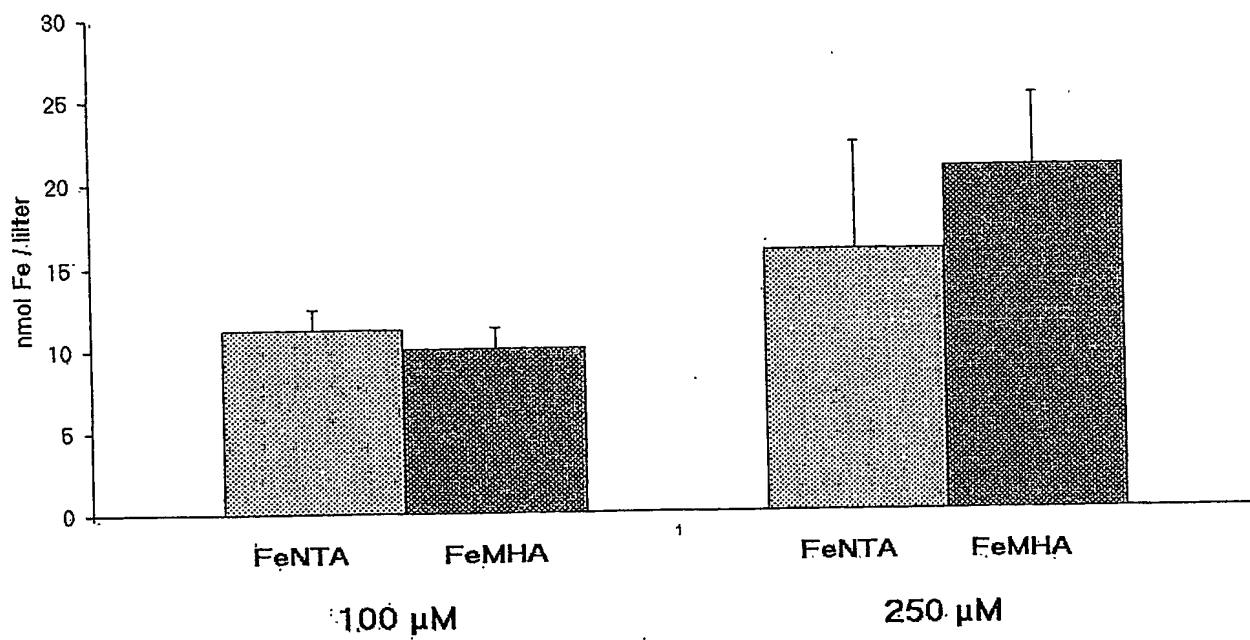


MI 2003A 000863

FIGURA 4

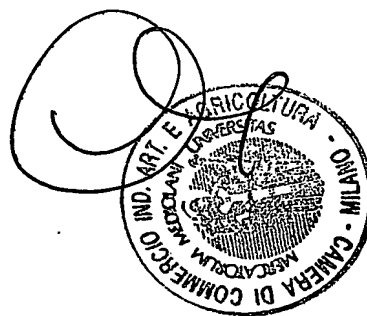


IL MANDATARI
Ing. Marino SALVADORI
Iscritto all'Albo con il n.



MI 2003 A 0 0 0 8 6 3

FIGURA 5



IL MANDATARIO
Ing. Martino SALVADORI
Iscritto all'Albo con il n. 438

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ BLACK BORDERS

☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES

☐ FADED TEXT OR DRAWING

☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING

☐ SKEWED/SLANTED IMAGES

☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS

☐ GRAY SCALE DOCUMENTS

☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT

☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY

☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.